

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 27 octobre 1997 (27.10.97)	
Demande internationale no PCT/FR97/00649	Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/58.590
Date du dépôt international (jour/mois/année) 11 avril 1997 (11.04.97)	Date de priorité (jour/mois/année) 12 avril 1996 (12.04.96)
Déposant KLEIN, Frédéric etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 octobre 1997 (11.10.97)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Céline Faust

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA  
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

09/155982

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

26 octobre 1998 (26.10.98)

Demande internationale no

PCT/FR97/00649

Date du dépôt international

11 avril 1997 (11.04.97)

Déposant

CONSEIL GENERAL DE L'ORNE etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

\_\_\_\_\_ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)a))

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

C. Carrié

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

28 Rec'd PCT/PTC 09 OCT 1998

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal  
Cabinet Armengaud ARMENGAUD AINE  
3, avenue Bugeaud R.F.C.U.  
F-75116 Paris  
FRANCE  
31. OCT. 1997

Date d'expédition (jour/mois/année) 23 octobre 1997 (23.10.97)		AVIS IMPORTANT	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/58.590			
Demande internationale no PCT/FR97/00649	Date du dépôt international (jour/mois/année) 11 avril 1997 (11.04.97)	Date de priorité (jour/mois/année) 12 avril 1996 (12.04.96)	
Déposant CONSEIL GENERAL DE L'ORNE etc			

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
AU,BR,CA,CN,EP,IL,JP,KP,KR,NO,PL,SK,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BY,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GE,GH,HU,IS,KE,KG,KZ,LC,  
LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NZ,OA,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,  
UZ,VN,YU  
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le  
23 octobre 1997 (23.10.97) sous le numéro WO 97/39034

**RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)**

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))**

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

Suite du formulaire PCT/IB/308

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE  
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

<b>Date d'expédition (jour/mois/année)</b> 23 octobre 1997 (23.10.97)	<b>AVIS IMPORTANT</b>
<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> CP/58.590	<b>Demande internationale no</b> PCT/FR97/00649
<p>Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.</p>	

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal  
Cabinet Armengaud Ainé  
3, avenue Bugeaud  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

26 mai 1997 (26.05.97)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

CP/58.590

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR97/00649

Date du dépôt international

11 avril 1997 (11.04.97)

Date de priorité

12 avril 1996 (12.04.96)

Déposant

CONSEIL GENERAL DE L'ORNE etc

La date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes suivantes est notifiée au déposant:

Demande antérieure no:Date de priorité:Pays dans lequel ou pour lequel  
la demande a été déposée:Date de réception du  
document de priorité

96/04623

12 avr 1996 (12.04.96)

FR

20 mai 1997 (20.05.97)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:—

Céline Faust

*C Faust*

no de téléphone: (41-22) 730.91.11

# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>CP/58.590</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 97/00649</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>11/04/1997</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>12/04/1996</b>
Déposant <b>CONSEIL GENERAL DE L'ORNE et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

- ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
- ☐ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
  - ☐ déposé avec la demande internationale
  - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
    - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
  - ☐ transcrit par l'administration

- En ce qui concerne le titre, ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.  
☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**MOYENS POUR LA DETECTION DE BACTERIES DE L'ESPECE TAYLORELLA EQUIGENITALIS ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES**

- En ce qui concerne l'abrégé, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant  
☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

- La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.  
☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.  
☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C07K16/12 C07K16/42 C07K14/285 C12N5/06 G01N33/569  
 G01N33/577 A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N G01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THE VETERINARY RECORD, vol. 118, no. 20, 17 Mai 1986, LONDRES, GRANDE BRETAGNE, page 562 XP000615390 A. MACMILLAN ET AL.: "Antibodies reactive with Taylorella equigenitalis in equine sera." voir le document en entier ---	1-5,7, 11-14,16
A	WO 86 02360 A (TECHNOLOGY LICENCE COMPANY LIMITED) 24 Avril 1986 voir exemples voir revendications --- -/--	1-5,7, 9-14,16

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, Octobre 1988, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 155-161, XP000615355 M. EGUCHI ET AL.: "Passive hemagglutination test for detection of antibodies against Taylorella (Haemophilus) equigenitalis in sera of mares." voir abrégé ---	1-5,7, 11-14,16
P,X	VETERINARY RESEARCH, vol. 28, no. 1, 1997, PARIS, FRANCE, pages 65-76, XP002038656 D. GRADINARU ET AL.: "Production and characterization of monoclonal antibodies against Taylorella equigenitalis." voir le document en entier -----	1-16

### Information on patent family members

PCT/FR 97/00649

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

10

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR97/00649	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 11 April 1997 (11.04.1997)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 12 April 1996 (12.04.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/12, 16/42, 14/285, C12N 5/06, G01N 33/569, 33/577, A61K 39/395		
Applicant CONSEIL GENERAL DE L'ORNE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 October 1997 (11.10.1997)	Date of completion of this report 16 June 1998 (16.06.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR97/00649

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 34, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1 - 15, filed with the letter of 30 April 1998 (30.04.1998),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2, 2/2, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 97/00649

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1. Although on the priority date of the present application, the existence of a **particular kind of** monoclonal anti-*Taylorella Equigenitalis* (AcM anti-Te) antibody was quite within the scope of a person skilled in the art, cf. documents

D1 = The Veterinary Record 118/20, 1986, p.562

D2 = Veterinary Microbiology 18/2, 1988, pp.155-161

and the traditional Köhler-Milstein method, which represents a tool commonly used in genetic molecular sciences, the AcMs of claim 1 possessing the **particular** features recited, such as the absence of crossed reactions, are considered to be inventive given the uncertain nature of the method of preparing AcM.

The subject matter of claim 1 therefore satisfies the criteria of PCT Article 33(2) and (3).

- 1.1 This opinion is also valid for the AcMs of claim 3, characterized by their production method comprising a selection step according to the inventive criterion of claim 1, and for the subject matter of

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 97/00649

claims 4 to 15, which relate directly or indirectly  
to claim 1.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 97/00649

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

As required by PCT Rule 70.10, the international preliminary examination authority cites the document **Veterinary Research 28/1, 1997, pages 65-76.**

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. This observation applies to claim 3 in which **particular kinds of** monoclonal antibodies are characterized by a production method ("...they can be obtained..." signifying that this is not a unique method).

In general terms, a product/substance cannot be distinguished from one which is known merely by indicating its preparation method, since the latter does not include any technical features relating to the structure of the product/substance.

In order to avoid any objections being raised as to a lack of novelty and clarity in an examination procedure at regional/national level, it should be pointed out that the AcMs of claim 3 do not contain these technical features which are necessary to characterize their structure; this could easily be solved by replacing "*Monoclonal antibodies...*" with "*Monoclonal antibodies described in claim 1...*".

2. The monoclonal anti-antibodies of claim 5 should be named "**anti-idiotypic** monoclonal antibodies"; the simple term "anti-antibodies" also covers any antibody interacting in a non-specific manner, for example with the  $F_c$  portion of the monoclonal antibody in question.

Such an amendment to the designation of the AcMs of claim 5 appears to be supported by example 6.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 18 JUN 1998

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/VB 58590-659	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR97/00649	Date du dépôt international (jour/mois/année) 11/04/1997	Date de priorité (jour/mois/année) 12/04/1996
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/12		
Déposant CONSEIL GENERAL DE L'ORNE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 5 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/10/1997	Date d'achèvement du présent rapport <b>16. 06. 98</b>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé  Goetz, M  N° de téléphone (+49-89) 2399-8697



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR97/00649

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-34                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-15                      reçue(s) le                      06/05/1998    avec lettre du                      30/04/1998

**Dessins, feuilles:**

1/2,2/2                      version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description,    pages :  
☐ des revendications, n°s :  
☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR97/00649

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VI. Certain documents cités**

**1. Certains documents publiés (règle 70.10)**

et / ou

**2. Divulgations non écrites (règle 70.9)**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**RAPPORT D'EXAMEN**  
**PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

---

Demande internationale n° PCT/FR97/00649

**Base de l'opinion**

**Description, pages:**

1-34 version initiale

**Revendications, N°:**

1-15 reçue(s) le 06/05/1998 avec lettre du 30/04/1998

**Dessins, feuilles:**

1/2,2/2 version initiale

---

**Opinion motivée**

1. Bien qu'à la date de priorité de la présente demande, l'existence d'un anticorps monoclonal anti-*Taylorella Equigenitalis* (AcM anti-Te) **quelconque** était tout à fait à la portée de l'homme du métier, cf. les documents

**D1 = The Veterinary Record 118/20, 1986, p. 562**

**D2 = Veterinary Microbiology 18/2, 1988, p. 155 - 161.**

et la méthode classique de Köhler-Milstein, qui représente un outil utilisé couramment dans les sciences de génétique moléculaire, les AcM de la revendication 1, possédant les caractéristiques **particulières** décrites, telle que l'absence de réactions croisées, sont considérés inventives, vu la nature aléatoire du procédé de préparation d'AcM.

L'objet de la revendication 1 satisfait donc aux critères énoncés aux Art. 33(2) et (3) PCT.

- 1.1. Cette opinion est également valable pour les AcM de la revendication 3, caractérisés par leur procédé de production comprenant une étape de sélection selon le critère inventif de la revendication 1, et pour l'objet des revendications 4 - 15 qui se rattachent de manière directe ou indirecte à la revendication 1.

**Certains documents cités**

Conformément à la règle 70.10 PCT, l'administration chargée de l'examen international préliminaire cite le document **Veterinary Research 28/1, 1997, pages 65 - 76.**

**Observations**

1. Cette observation s'applique à la revendication 3, dans laquelle des anticorps monoclonaux **quelconques** sont caractérisés par un procédé de production ("*... ils peuvent être obtenus ...*" signifiant qu'il ne s'agit pas d'un procédé unique).

D'une manière générale, un produit/une substance ne peut être distingué d'un produit/d'une substance connue par l'indication seule de son procédé de préparation, puisque celui-ci ne comprend pas de caractéristique technique relative à la structure du produit/de la substance.

Afin d'éviter toute objection de manque de nouveauté et de clarté dans une procédure d'examen au niveau régional/national, il convient de signaler que les AcM de la revendication 3 ne comprennent pas ces éléments techniques nécessaires à caractériser leur structure, ce qui pourrait aisément être résolu en remplaçant "*Anticorps monoclonaux ...*" par "*Anticorps monoclonaux selon la revendication 1 ...*".

2. Il conviendrait de nommer les anti-anticorps monoclonaux de la revendication 5 "**anticorps monoclonaux anti-idiotyp**"; en effet, le terme simple "anti-anticorps" embrasse aussi tout anticorps interagissant d'une manière non-spécifique avec par exemple la portion  $F_c$  de l'anticorps monoclonal en question.

Il apparaît qu'une telle modification de la désignation des AcM de la revendication 5 est supportée par l'exemple 6.

## REVENDICATIONS

- 1/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, plus particulièrement, leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*, et en ce qu'ils ne présentent pas de réaction croisée avec un ou des épitope(s) d'une bactérie d'une espèce *Taylorella* différente ou d'une bactérie d'un genre différent.
- 2/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître des protéines de *T. equigenitalis* du groupe comprenant des protéines telles que les protéines de 150 kDa, 120 kDa, 52,7 kDa ou 22 (LPS) kDa.
- 3/ Anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils peuvent être obtenus à partir d'hybrides
- par fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* inactivée ou d'extrait(s) d'une telle souche, et
  - clonage et sélection selon la propriété de leur surnageant de culture à reconnaître un ou des épitope(s) d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*, et à ne pas présenter de réaction croisée avec un ou des épitope(s) d'une bactérie d'une espèce *Taylorella* différente ou d'une bactérie d'un genre différent,
  - récupération des anticorps monoclonaux recherchés, suivie le cas échéant d'une purification.
- 4/ Protéines immunogènes, caractérisées en ce qu'elles sont capables d'interagir avec des anticorps

monoclonaux ou leurs fragments selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5/ Anticorps monoclonaux, et leurs fragments, particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anti-anticorps, à savoir d'anticorps capables d'interagir avec les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

6/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* ou d'extrait(s) d'une telle souche,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que notamment l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture présentent une réaction positive avec une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis* ou un fragment de celle-ci,

- la sélection par clonage de tels hybridomes au regard de leur réactivité, par rapport à *T. equigenitalis*, et

- la récupération des anticorps monoclonaux, suivie le cas échéant de leur purification.

7/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de leurs fragments tels que défini(s) dans l'une des revendications 1 à 3,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que notamment l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture présentent une réaction positive avec l'un desdits  
5 anticorps monoclonaux ou leurs fragments,

- la sélection par clonage de tels hybridomes, et
- la récupération des anti-anticorps recherchés.

8/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon  
10 l'une quelconque des revendications 1 à 3.

9/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon la revendication 5.

10/ Méthode d'identification d'une bactérie de  
15 l'espèce *T. equigenitalis* dans un échantillon ou dans une culture, comprenant :

- la mise en contact de l'échantillon ou de la culture à analyser, susceptible de renfermer *T. equigenitalis*, avec

20 i. une quantité efficace d'au moins un anticorps monoclonal ou un fragment d'un tel anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et, optionnellement, blocage des réactions non antigène-anticorps,

25 ii. ou, en variante, pour mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *T. equigenitalis* avec une protéine immunogène selon la revendication 4 ou un anticorps selon la revendication 5,

dans des conditions permettant une réaction du type antigène-anticorps, et

30 - la révélation du produit de réaction de type antigène-anticorps éventuellement formé.

11/ Méthode de diagnostic d'une infection par *T. equigenitalis*, plus particulièrement de la métrite contagieuse équine dans un échantillon ou une culture, comprenant :

5           - la mise en contact d'un ou plusieurs anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou de leurs fragments, avec un prélèvement biologique, et

10           - la révélation de la réaction du type antigène-anticorps produite dans le cas de la présence de *T. equigenitalis* dans le prélèvement,

15           - et, optionnellement, le blocage des réactions non antigène-anticorps, par exemple, par saturation de l'échantillon prélevé à l'aide d'un sérum dépourvu d'anticorps anti-*T. equigenitalis*.

12/ Kits pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisés en ce qu'ils comportent

20           - un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou au moins une protéine immunogène selon la revendication 4, ou un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon la revendication 5,

25           - les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction immunologique visée, et, optionnellement, des réactifs de blocage des réactions non antigène-anticorps tels que sérum de souris,

30           - ainsi qu'une notice d'utilisation.

13/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment un ou plusieurs anticorps

monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, seuls ou en association avec des véhicules pharmaceutiquement inertes.

14/ Compositions vaccinales, caractérisées en ce qu'elles renferment, en association avec des excipients physiologiquement acceptables, au moins une protéine immunogène telle que définie selon la revendication 4, ou un anticorps selon la revendication 5, ou un fragment d'un tel anticorps, en quantité suffisante pour susciter une réaction immunitaire.

15/ Utilisation des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 3 pour l'élaboration de biocapteurs.

**PCT**  
28 Rec'd PCT/PTO 09 OCT 1998

Réservé à l'office récepteur

# REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) CP/58.590

**Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION** Moyens pour la détection de bactéries du genre Taylorella et applications biologiques

**Cadre n° II DEPOSANT**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Conseil Général de l'Orne  
Hôtel du Département  
39, rue Saint-Blaise  
B.P. 528  
61017 ALENCON CEDEX  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

**Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

KLEIN Frédéric  
7-9 Avenue du Basingstoke  
61000 ALENCON  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

**Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE**

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: ☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

PEAUCELLE Chantal et ARMENGAUD Alain  
Cabinet ARMENGAUD AINE  
3, Avenue Bugeaud  
75116 PARIS, FRANCE

n° de téléphone

1-45-53-05-50

n° de télécopieur

1-47-55-12-96

n° de téléimprimeur

☐ Cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

## Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS

*Si aucun des sous-cadres suivants ne sont utilisés, la présente feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

GRADINARU Dragos  
21, rue l'Abbé Letacq  
61000 ALENCON  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : ROUMANIE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

**Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS**

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être):

**Brevet régional**

- ☒ **AP** Brevet **ARIPO** : **KE** Kenya, **LS** Lesotho, **MW** Malawi, **SD** Soudan, **SZ** Swaziland, **UG** Ouganda et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ **EA** Brevet **eurasien** : **AM** Arménie, **AZ** Azerbaïdjan, **BY** Bélarus, **KG** Kirghizistan, **KZ** Kazakstan, **MD** République de Moldova, **RU** Fédération de Russie, **TJ** Tadjikistan, **TM** Turkménistan, et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasién et du PCT
- ☒ **EP** Brevet **européen** : **AT** Autriche, **BE** Belgique, **CH** et **LI** Suisse et Liechtenstein, **DE** Allemagne, **DK** Danemark, **ES** Espagne, **FI** Finlande, **FR** France, **GB** Royaume-Uni, **GR** Grèce, **IE** Irlande, **IT** Italie, **LU** Luxembourg, **MC** Monaco, **NL** Pays-Bas, **PT** Portugal, **SE** Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ **OA** Brevet **OAPI** : **BF** Burkina Faso, **BJ** Bénin, **CF** République centrafricaine, **CG** Congo, **CI** Côte d'Ivoire, **CM** Cameroun, **GA** Gabon, **GN** Guinée, **ML** Mali, **MR** Mauritanie, **NE** Niger, **SN** Sénégal, **TD** Tchad, **TG** Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) .....

**Brevet national** (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

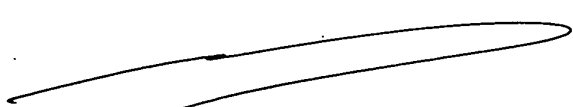

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albanie .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg .....                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Arménie .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Lettonie .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Autriche .....                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> République de Moldova .....                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australie .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar .....                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaïdjan .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> Ex-République yougoslave de Macédoine ..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnie-Herzégovine .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolie .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbade .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgarie .....                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexique .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brésil .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norvège .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Bélarus .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> Nouvelle-Zélande .....                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Pologne .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH</b> et <b>LI</b> Suisse et Liechtenstein .....       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> Chine .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Roumanie .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba .....                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Fédération de Russie .....                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> République tchèque .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Soudan .....                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Allemagne .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Suède .....                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Danemark .....                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapour .....                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonie .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovénie .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Espagne .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovaquie .....                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finlande .....                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tadjikistan .....                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> Royaume-Uni .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkménistan .....                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Géorgie .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turquie .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hongrie .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinité-et-Tobago .....                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israël .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Islande .....                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Ouganda .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japon .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> Etats-Unis d'Amérique .....                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Ouzbékistan .....                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kirghizistan .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> République populaire démocratique de Corée ..... |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> République de Corée .....                        |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakstan .....                                  |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Sainte-Lucie .....                               |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka .....                                  |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Libéria .....                                    |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho .....                                    |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lituanie .....                                   |   |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☒ **GH** Ghana .....
- ☒ **YU** Yougoslavie .....
- ☐ .....
- ☐ .....

Outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, sauf la désignation de .....

Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

<b>Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE</b>			D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire <input type="checkbox"/>																										
La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :																													
Pays (dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Demande n°	Office de dépôt (seulement s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale)																										
(1)  FRANCE	12/04/1996	96 04 623																											
(2)																													
(3)																													
<p>Cocher la case ci-dessous si la copie certifiée conforme de la demande antérieure doit être délivrée par l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur (une taxe peut être exigée) :</p> <p><input type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer, et de transmettre au Bureau international, une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____</p>																													
<b>Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE</b>																													
<p><b>Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)</b>  <i>(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :</i> ISA / _____</p> <p><b>Recherche antérieure</b> Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette administration et si cette administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de cette recherche antérieure. Pour permettre d'identifier cette recherche ou cette demande de recherche, donner les renseignements demandés ci-après pour la demande de brevet pertinente (ou sa traduction) ou pour la demande de recherche :</p> <p>Pays (ou office régional) : FRANCE      Date (jour/mois/année) : 12/04/1996      Numéro : FA 530 542</p>																													
<b>Cadre n° VIII BORDEREAU</b>																													
<p>La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant :</p> <table style="width: 100%;"> <tr><td>1. requête</td><td>: 04</td><td>feuilles</td></tr> <tr><td>2. description</td><td>: 34</td><td>feuilles</td></tr> <tr><td>3. revendications</td><td>: 05</td><td>feuilles</td></tr> <tr><td>4. abrégé</td><td>: 01</td><td>feuilles</td></tr> <tr><td>5. dessins</td><td>: 02</td><td>feuilles</td></tr> <tr><td><b>Total</b></td><td><b>: 46</b></td><td><b>feuilles</b></td></tr> </table>		1. requête	: 04	feuilles	2. description	: 34	feuilles	3. revendications	: 05	feuilles	4. abrégé	: 01	feuilles	5. dessins	: 02	feuilles	<b>Total</b>	<b>: 46</b>	<b>feuilles</b>	<p>Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé</td> <td>5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes</td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général</td> <td>6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés</td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature</td> <td>7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)</td> </tr> <tr> <td>4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :</td> <td>8. <input type="checkbox"/> autres éléments (préciser) :</td> </tr> </table>		1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes	2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés	3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)	4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :	8. <input type="checkbox"/> autres éléments (préciser) :
1. requête	: 04	feuilles																											
2. description	: 34	feuilles																											
3. revendications	: 05	feuilles																											
4. abrégé	: 01	feuilles																											
5. dessins	: 02	feuilles																											
<b>Total</b>	<b>: 46</b>	<b>feuilles</b>																											
1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes																												
2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés																												
3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)																												
4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :	8. <input type="checkbox"/> autres éléments (préciser) :																												
La figure n° _____ des dessins (le cas échéant) est proposée pour publication avec l'abrégé.																													
<b>Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE</b>																													
A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.																													
 <b>ARMENGAUD Alain</b>		 <b>PEAUCELLE Chantal</b>																											

Réservé à l'office récepteur		2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :		
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :		
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :		
5. Administration chargée de la recherche internationale indiquée par le déposant : ISA /		6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

Réservé au Bureau international
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 16/12, 16/42, 14/285, C12N 5/06,</b> <b>G01N 33/569, 33/577, A61K 39/395</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/39034</b> <b>(43) Date de publication internationale: 23 octobre 1997 (23.10.97)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00649 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 11 avril 1997 (11.04.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/04623 12 avril 1996 (12.04.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CONSEIL GENERAL DE L'ORNE [FR/FR]; Hôtel du Département, 39, rue Saint-Blaise, Boîte postale 528, F-61017 Alençon Cédex (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> KLEIN, Frédéric [FR/FR]; 7-9, avenue du Basingstoke, F-61000 Alençon (FR). GRADINARU, Dragos [RO/FR]; 21, rue l'Abbé- Letacq, F-61000 Alençon (FR). <b>(74) Mandataires:</b> PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
<b>(54) Title: MEANS FOR DETECTING BACTERIA OF THE TAYLORELLA EQUIGENITALIS SPECIES AND THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS</b> <b>(54) Titre: MOYENS POUR LA DETECTION DE BACTERIES DE L'ESPECE TAYLORELLA EQUIGENITALIS ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES</b> <b>(57) Abstract</b> The invention concerns monoclonal antibodies and their biological applications. These monoclonal antibodies are characterised by the fact that they recognize an epitope of a bacterium of the <i>T. equigenitalis</i> species. <b>(57) Abrégé</b> L'invention se rapporte à des anticorps monoclonaux et à leurs applications biologiques. Ces anticorps monoclonaux sont caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce <i>T. equigenitalis</i> .		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MX	Mexique	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	NE	Niger	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NL	Pays-Bas	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NO	Norvège	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NZ	Nouvelle-Zélande	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	PL	Pologne	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PT	Portugal		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	RO	Roumanie		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RU	Fédération de Russie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	SD	Soudan		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SE	Suède		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SG	Singapour		
DK	Danemark	LR	Libéria				
EE	Estonie						

MOYENS POUR LA DETECTION DE BACTERIES DE L'ESPECE TAYLORELLA EQUIGENITALIS  
ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES

L'invention a pour objet des moyens pour la  
détection de bactéries du genre *Taylorella* et leurs  
5 applications biologiques.

Elle vise en particulier la détection de *T.*  
*equigenitalis* et le traitement ou la prévention  
d'infections provoquées par des bactéries de cette  
espèce.

10 La première souche de *T. equigenitalis* a été isolée  
par Crowhurst, 1977, Vet. Rec. 100, 476 et caractérisée  
par Taylor et al., 1978, Equine Vet. J. 10, 136-134.  
Cette bactérie est l'agent d'une maladie vénérienne des  
équidés dénommée métrite contagieuse équine (désignée ci-  
15 après par MCE).

Depuis le déclenchement de cette maladie en 1977 à  
Newmarket (Grande-Bretagne), la MCE s'est répandue parmi  
la population équine dans le monde (Europe, USA, Japon).

La MCE a été initialement caractérisée par  
20 l'apparition d'écoulements vaginaux purulents causés par  
une endométrite aiguë. L'épidémiologie et les  
manifestations cliniques de la maladie ont maintenant  
changé. Il ne subsiste que quelques rares foyers  
présentant une forme aiguë de la MCE ; il s'agit alors de  
25 contaminations de plusieurs juments faisant partie d'un  
même harem. Les formes cliniques de métrite sont, en  
effet, devenues rares et *T. equigenitalis* est  
principalement trouvée chez des porteurs asymptomatiques  
ou au stade pré-clinique. La maladie est transmise par  
30 les étalons qui ne manifestent aucun symptôme clinique.

La MCE constitue une entrave à l'échange international des équidés et son dépistage est préconisé par l'OIE (Office International des Epizooties, liste B).

Les moyens indirects de dépistage tels que la sérologie ont été abandonnés par de nombreux pays comme les USA, la Grande-Bretagne et la France.

Des moyens directs de dépistage sont pratiqués : dépistage par culture bactériologique dans de nombreux pays, dépistage par immunofluorescence indirecte.

En France, les mesures prophylactiques comprennent à la fois la culture bactériologique et l'immunofluorescence indirecte (IIF).

Un dépistage systématique des étalons est devenu obligatoire préalablement à chaque saison de monte.

Pour des raisons à la fois économiques et d'organisation, ce dépistage systématique ne peut se faire qu'à partir d'un ou de deux prélèvement(s) par animal et par saison. La fiabilité du dépistage en est donc d'autant plus cruciale.

Le test de dépistage d'une infection par *T. equigenitalis* actuellement pratiqué en France repose principalement sur l'isolement de la bactérie par culture sur milieux nutritifs et/ou sélectifs et sur l'identification de cet agent selon des critères morphologiques et biochimiques. Or, *T. equigenitalis* est une bactérie très fragile et à très lente croissance (le délai d'observation des boîtes d'ensemencement est d'au moins 6 jours). Elle est, de plus, susceptible d'être inhibée par d'autres bactéries de la flore examinée. Les critères d'identification des différentes souches de *T. equigenitalis* sont eux-mêmes soit trop succincts et sujets à variations (mise en évidence d'absence

d'activité pour les trois activités enzymatiques classiques que *T. equigenitalis* présente), soit trop lourds à gérer dans les délais requis. Le dépistage par la seule technique de bactériologie est donc devenu une  
5 méthode hasardeuse de diagnostic. Un pourcentage non déterminé de porteurs sains est ainsi chaque saison considéré comme non infecté.

Un second test de dépistage d'une infection par *T. equigenitalis* a été retenu en France. Ce test est basé  
10 sur l'identification de la bactérie par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antisérum fabriqué sur lapin et d'anticorps fluorescents anti-lapin. Ce test de dépistage présente l'avantage de livrer ses résultats beaucoup plus rapidement (24 à 48 heures)  
15 qu'un test par culture bactériologique.

L'utilisation de cette technique peut toutefois conduire à des erreurs par excès (faux positifs), les antisera utilisés donnant lieu, dans de nombreux cas, à des réactions avec des espèces autres que *T. equigenitalis*.  
20

La portée de ces résultats est ainsi très restreinte: si le test d'immunofluorescence est négatif, le laboratoire agréé peut communiquer une conclusion négative, mais, si le résultat est positif, ce résultat  
25 doit être confirmé ou infirmé par la bactériologie.

Les inventeurs ont recherché à remédier à ces difficultés de dépistage d'une infection par *T. equigenitalis*, en élaborant de nouveaux moyens permettant d'identifier une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*  
30 sans risque ni de faux positifs, ni de faux négatifs. La

L'invention vise donc à fournir des moyens pour une détection spécifique, de grande fiabilité, de *T. equigenitalis*, basés sur les reconnaissances de type antigène-anticorps défini.

5 Elle vise également l'utilisation de ces moyens pour le diagnostic, le traitement et la prophylaxie des maladies causées par *T. equigenitalis*.

Selon un premier aspect, les moyens de l'invention sont des anticorps monoclonaux caractérisés en ce qu'ils  
10 reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*.

De manière avantageuse, ces anticorps ne présentent pas de réactions croisées avec un ou des épitopes d'une bactérie *Taylorella* d'une espèce différente ou d'une  
15 bactérie d'un genre différent. Ils permettent donc de détecter *T. equigenitalis* avec sûreté et, selon un aspect de grand intérêt, à l'aide d'un seul test.

Les anticorps monoclonaux de l'invention (désignés ci-après par AcM en abrégé) sont également tels  
20 qu'obtenus à partir d'hybrides, par fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* inactivée ou d'extrait(s) d'une telle souche, clonage et sélection  
25 selon la propriété de leur surnageant de culture à reconnaître un ou des épitope(s) d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*, et récupération des anticorps recherchés, suivie le cas échéant de leur purification.

L'invention vise également les fragments des AcM  
30 définis ci-dessus, plus particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>.

Les AcM de l'invention et, le cas échéant, leurs fragments, sont encore caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître des protéines de *T. equigenitalis* du groupe comprenant des protéines telles que les  
5 protéines de 150, 120, 52,7 ou 22 (LPS) kDa.

Selon un deuxième aspect, les moyens de l'invention sont des protéines immunogènes caractérisées en ce qu'elles sont capables d'interagir avec lesdits AcM ou leurs fragments.

10 Ces protéines sont obtenues, grâce aux dits AcM ou à leurs fragments, à partir de *T. equigenitalis*, ou par voie de synthèse.

Selon un troisième aspect, les moyens de l'invention sont des anti-anticorps (désignés ci-après par anti-AcM  
15 en abrégé) et les fragments de ces anti-anticorps, ces anti-AcM et leurs fragments étant caractérisés en ce qu'ils sont capables d'interagir avec les AcM ou leurs fragments définis plus haut.

L'invention vise également des procédés d'obtention  
20 des moyens définis ci-dessus.

Pour produire les AcM de l'invention, ou les anti-AcM, on a avantageusement recours à la technique d'obtention d'hybridomes telle que décrite par Köhler et Milstein dans Nature 1975, 256, 495-497.

25 L'invention vise donc un procédé d'obtention et de sélection des AcM définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
30 immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* ou d'extrait(s) d'une telle souche,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que, notamment, l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture présentent une réaction positive avec une bactérie de 5 l'espèce *T. equigenitalis* ou un fragment de celle-ci,
- le clonage de tels hybridomes, au regard de leur réactivité par rapport à *T. equigenitalis*, et
- la récupération des AcM recherchés, suivie le cas échéant de leur purification.

10 L'invention vise également l'application de la technique ci-dessus pour la production d'anticorps anti-AcM.

On utilise dans ce cas des cellules spléniques de souris immunisées au préalable à l'aide des AcM déjà 15 définis. Les souches clonées peuvent être conservées dans de l'azote liquide et leurs surnageants de culture à -20°C. Ces souches qui sont caractérisées par le fait qu'elles sont capables de produire des AcM ou respectivement des anti-AcM, tels que définis ci-dessus, 20 entrent également dans le cadre de l'invention. De manière générale, l'invention vise les souches d'hybridomes telles qu'obtenues selon les procédés définis plus haut.

Les fragments des AcM et les anti-AcM peuvent être 25 aisément obtenus à l'aide des techniques enzymatiques conventionnelles.

Avec les trois aspects définis ci-dessus, à savoir les AcM ou leurs fragments, les protéines immunogènes, et les anti-AcM ou leurs fragments, l'invention fournit les 30 moyens pour établir, soit directement, soit indirectement, une contamination éventuelle d'un

échantillon ou d'une culture avec une bactérie de l'espèce de *T. equigenitalis*.

Dans le cadre d'une telle détermination, l'invention vise une méthode d'identification d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis* ou d'un ou plusieurs épitopes d'une telle bactérie dans un échantillon ou dans une culture, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact de l'échantillon ou de la culture à analyser, susceptible de renfermer *T. equigenitalis*, avec

i. une quantité efficace d'au moins un AcM ou un fragment d'AcM tel que défini ci-dessus et, optionnellement, blocage des réactions non antigène-anticorps, par exemple par saturation de l'échantillon ou de la culture à analyser à l'aide de sérum, tel que sérum de souris, dépourvu d'anticorps anti-*T. equigenitalis*,

ii. ou en variante, pour mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *T. equigenitalis*, avec une quantité efficace d'une protéine immunogène ou d'anticorps anti-AcM, ou de fragments de ce dernier, tels que définis ci-dessus, dans des conditions permettant une réaction du type antigène-anticorps, et.

- la révélation du produit de réaction de type antigène-anticorps éventuellement formé.

L'étape de mise en contact est réalisée dans des conditions notamment de durée, température, tampon, permettant l'établissement d'une réaction de type antigène-anticorps. Pour la révélation, on utilise des marqueurs, par exemple des marqueurs fluorescents, enzymatiques, radioactifs ou luminescents.

On remarquera que le choix judicieux d'un AcM particulier, ou d'un fragment de cet AcM, permet d'identifier directement un épitope donné de *T. equigenitalis* dans un échantillon ou une culture à analyser. En utilisant une protéine immunogène ou un anticorps anti-AcM ou un fragment de ce dernier, on mettra en évidence un contact préalable de l'échantillon ou de la culture avec la bactérie.

L'absence de réactions croisées des AcM de l'invention et de leurs fragments avec des épitopes de bactéries du genre *Taylorella* autres que *T. equigenitalis*, et de bactéries d'un genre différent, est avantageusement mise à profit pour le diagnostic de pathologies liées à *T. equigenitalis*.

L'invention vise donc également l'utilisation desdits AcM et de leurs fragments pour le diagnostic d'une infection par *T. equigenitalis*, plus particulièrement de la métrite équine contagieuse, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un ou plusieurs AcM de l'invention, ou de leurs fragments, avec un prélèvement biologique, et

- la révélation de la réaction du type antigène-anticorps produite dans le cas de la présence de *T. equigenitalis* dans le prélèvement,

- et, optionnellement, le blocage des réactions non antigène-anticorps, par exemple, par saturation de l'échantillon prélevé à l'aide d'un sérum, tel qu'un sérum de souris, dépourvu d'anticorps anti-*T. equigenitalis*.

Les étapes de mise en contact et de révélation sont avantageusement mises en oeuvre comme indiqué pour la méthode précédente.

L'invention fournit également des kits pour la mise en oeuvre des méthodes d'identification et des méthodes de diagnostic décrites ci-dessus.

Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils  
5 renferment

- un ou plusieurs AcM ou leurs fragments ou au moins une protéine immunogène, ou un ou plusieurs anti-AcM ou leurs fragments,
- les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons,  
10 permettant la révélation de la réaction immunologique visée, et, optionnellement, des réactifs de blocage des réactions non antigène-anticorps tels que sérum de souris,
- ainsi qu'une notice d'utilisation.

15 Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, les AcM et leurs fragments définis ci-dessus sont utilisables en thérapeutique pour lutter contre une infection par *T. equigenitalis*, et plus particulièrement contre la métrite équine contagieuse.

20 L'invention vise ainsi également des compositions pharmaceutiques renfermant un ou plusieurs AcM, ou leurs fragments, définis ci-dessus, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, seuls ou en association avec des véhicules  
25 pharmaceutiquement inertes. Elle vise également leur utilisation pour l'élaboration de biocapteurs.

Selon encore une autre disposition, l'invention vise l'utilisation des protéines immunogènes et des anti-AcM ou leurs fragments pour l'élaboration de compositions  
30 vaccinales préventives d'une infection par *T. equigenitalis*.

Les compositions vaccinales de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment au moins une protéine immunogène ou un anti-AcM ou leurs fragments, tels que définis ci-dessus, en quantité suffisante pour  
5 susciter une réponse immunitaire, en association avec des excipients physiologiquement acceptables.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à  
10 3, qui représentent respectivement :

- la figure 1 représente une photo d'un test IIF (immunofluorescence indirecte) sur *T. equigenitalis* en présence d'AcM selon l'invention,

- la figure 2, une photo d'un immunoblot après  
15 réaction de protéines de *T. equigenitalis* avec des AcM de l'invention et du sérum de souris immunisée (sérum positif),

- la figure 3, une photo d'un dot blot réalisé sur les protéines non dénaturées d'une souche de *T.*  
20 *equigenitalis* de référence et mises à incuber avec les AcM selon l'invention, un sérum positif de souris (SP) ou un sérum négatif de souris (SN) (souris non immunisée).

**Exemple 1 : Obtention et sélection d'hybridomes**  
25 **capables de produire des anticorps monoclonaux anti-*T. equigenitalis***

- souches de *T. equigenitalis* utilisées pour l'immunisation

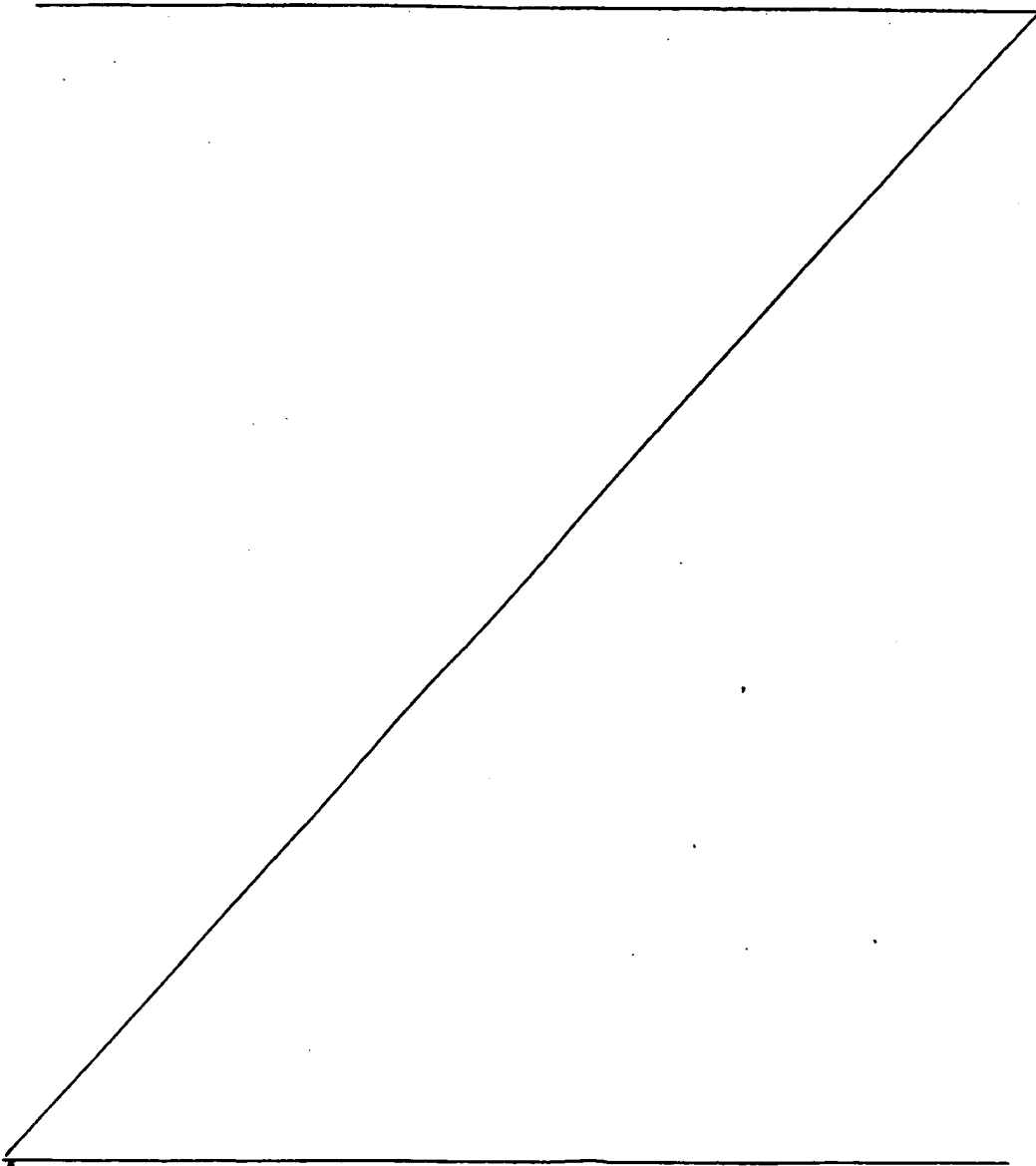
On rapporte les résultats obtenus avec les neuf  
30 souches suivantes :

## II

- deux souches de références (R1-16 et R2-19),  
provenant du Centre National d'Etudes Vétérinaires et  
Alimentaires - Laboratoire Central de Recherches  
Vétérinaires CNEVA-LCRV, Maisons-Alfort, France,

5 - sept souches dites souches sauvages isolées  
dans quatre régions différentes du

Nord-Ouest de la France (Indre et Loire,  
Calvados, Côtes d'Armor et Orne).



Ces souches sont identifiées dans le tableau I ci-après :

TABLEAU I

5	Désignation de la souche	Sources	Résistance à la streptomycine
	R1-16/16	CNEVA	S
10	R2-19/19	CNEVA	R
	1/ 129S	LVD37	R
	2/ 1	LVD14	R
	3/ 12.397	LDA22	R
	4/ 26.658	LDA22	R
15	5/ 7001-01	LDA22	R
	6/ 250	LVD61	R
	7/ 715	LVD61	R

S = sensible

20 R = résistante

Toutes ces souches sont cultivées sur des géloses d'agar chocolat avec ou sans addition d'actidione et de streptomycine. Elles sont incubées sous atmosphère humide à 7 % de CO<sub>2</sub>.

25 Les analyses de réaction enzymatique et de fermentation de sucre sont effectuées à l'aide du système API-NH (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

En outre, ces souches sont testées pour leur activité catalase, cytochrome-oxydase et par le test  
30 d'agglutination du sérum (SAT), en utilisant un antisérum polyclonal de lapin.

La plupart d'entre elles présentent

- une forme cocobacillaire à Gram négatif,
- une activité catalase et cytochrome oxydase, et
- elles répondent positivement au test d'agglutination SAT.

5 On constate qu'elles présentent toutes

- une activité phosphatase alcaline et gamma glutamyl transférase positives (excepté la souche de terrain 5 qui présente une activité gamma glutamyl transférase négative),

10 - des activités pénicillinase, ornithine-décarboxylase, uréase, lipase, bêtagalactosidase et proline-amyase négatives. On constate également qu'elles ne métabolisent pas les sucres (glucose, fructose, maltose, saccharose).

15

En outre, elles présentent des profils polypeptidiques et lipopolysaccharidiques très similaires.

20 Les deux souches de référence R1-16 et R2-19 présentent donc les propriétés généralement observées pour l'ensemble des souches de *T. equigenitalis* étudiées dans l'art antérieur et sont donc utilisées pour l'immunisation de souris.

#### 25 - immunisation de souris

Les souches de référence R1-16 et R2-19 sont lavées deux fois dans du tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 et inactivées par chauffage à 56°C pendant 75 min. Les cellules sont  
30 alors diluées dans le PBS, jusqu'à l'obtention de suspensions bactériennes de densité optique 0,77 à

380 nm. Elles sont ensuite réparties en portions aliquotes et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

On injecte par voie intra-péritonéale, à des souris adultes BALB/C 0,5 ml de suspension bactérienne R1-16 et  
5 R2-19 émulsifiées avec l'adjuvant complet de Freund (2 souris par souche). Une injection de rappel est effectuée au 14ème jour avec la même préparation. Au 21ème jour, les souris sont immunisées avec 0,2 ml de suspension sans adjuvant par voie intra-veineuse et les cellules  
10 spléniques sont recueillies 2 jours plus tard.

#### - production d'hybridomes

Les hybridomes sont produits selon la procédure  
15 standard décrite par Kohler et Milstein (voir référence ci-dessus).

Des cellules de myélomes de souris SP2-0-Ag14 et des cellules spléniques immunes sont fusionnées dans un rapport 1/5 en utilisant du PEG 1500 (Sigma, l'Isle  
20 d'Abeau, France) et maintenues dans des plaques de cultures cellulaires à 96 puits contenant des macrophages de souris ou des cellules nourricières de rate ou un supplément OPI (Sigma) dans un milieu sélectif HAT-DMEM.

Une croissance d'hybridome est observée dans 820 des  
25 1020 puits utilisés (81,37 %). On réalise les tests IIF sur 60 de ces 820 puits pour détecter les hybridomes producteurs des anticorps monoclonaux recherchés.

- criblage des hybridomes et des anticorps  
monoclonaux produits

Les hybridomes sont testés par immunofluorescence  
5 indirecte (IIF) pour la capacité de leurs surnageants à  
reconnaître les deux souches de référence de *T.*  
*equigenitalis*. On utilise la procédure standard décrite  
par Vaissaire et al. (1992), Bull. Acad. Vet. Fr. 65,  
161-170.

10 Après deux lavages dans PBS 0,1 M, pH 7,4, les  
souches bactériennes sont remises en suspension dans le  
tampon PBS contenant, de plus, 1 % de formaldéhyde afin  
d'obtenir une suspension ayant une turbidité de 1 dans  
l'échelle de Mac Farland.

15 On applique 10 µl de cette suspension sur chaque  
spot de lamelles fluorescentes.

Après séchage 15 min à 37°C, les lamelles sont  
fixées dans de l'acétone pur pendant 15 min à température  
ambiante.

20 Après séchage, les lamelles sont mises à incuber  
avec 40 µl de surnageants d'hybridomes, pendant 30 min à  
37°C.

Les lamelles sont ensuite lavées dans un bain de PBS  
sous agitation pendant 15 min. Après rinçage dans de  
25 l'eau distillée et séchage, les lamelles sont incubées 30  
min à 37°C avec 40 µl d'une solution d'isothiocyanate de  
fluorescéine conjugué à la fraction F (ab) 2 de lapin  
anti-souris (Eurobio Les Ulis, France), dilué à 1/40 dans  
PBS contenant du bleu Evans (1/10000).

30 Les lamelles sont enfin lavées dans du PBS, rincées  
dans de l'eau distillée, séchées comme indiqué ci-dessus,

montées dans du PBS renfermant 1 % de glycérine et examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

On utilise un sérum de souris non immunisée comme témoin négatif. Le conjugué d'antisérum de souris FITC  
5 est incubé avec chaque souche bactérienne pour servir de témoin de conjugué.

Les clones positifs au test IIF sont transférés pour expansion avant clonage dans des plaques à 24 puits contenant le milieu HAT-DMEM.

10 On rapporte sur la figure 1 un test IIF sur *T. equigenitalis* en présence d'AcM selon l'invention. Cette figure montre une forte fluorescence de la paroi bactérienne.

4 à 7 jours plus tard, les hybridomes de ces puits  
15 sont clonés par la méthode de dilution limite afin d'obtenir une cellule unique par puits dans une plaque de culture tissulaire à 96 puits en utilisant le milieu HT-DMEM et des cellules nourricières. Les puits contenant un seul clone sont criblés par IIF et les cellules positives  
20 sont congelées dans de l'azote liquide.

Parmi l'ensemble des clones positifs 14 d'entre eux sont utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux et la caractérisation de ces anticorps.

Les surnageants de cultures tissulaires d'hybridomes  
25 sont tamponnés par addition de Tris 1M, pH 8,0 (vol. 1/20) et de l'azide de sodium (0,02 %). Des préparations aliquotes sont effectuées et stockées à -20°C.

Exemple 2 : Caractérisation des anticorps  
30 monoclonaux anti-*T. equigenitalis*

- spécificité des anticorps monoclonaux

Afin de vérifier la spécificité des anticorps monoclonaux, les surnageants des 14 clones d'hybridomes obtenus selon l'exemple 1 sont testés par IIF selon la  
5 capacité de leurs surnageants à reconnaître d'autres souches bactériennes que les deux souches de référence R-16 et R-19 utilisées pour l'immunisation, à savoir :

- les 7 souches sauvages de *T. equigenitalis* décrites dans l'exemple 1, et
- 10 - des souches bactériennes décrites dans l'art antérieur comme donnant lieu à des réactions croisées avec les antisérums de *T. equigenitalis* ou couramment présentes dans la flore génitale : *Actinobacillus equuli*,  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*,  
15 *Pasteurella haemolytica*, *Streptococcus equi*,  
*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* et  
*Klebsiella pneumoniae*. Ces bactéries sont cultivées sur un milieu sang-agar base Columbia.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau  
20 II ci-après.

TABLEAU II

N°	Désignation de l'AcM	R1-R2-1 2 3 4 5 6 7 16 19														<i>K pneumoniae</i>	<i>Ps fluorescens</i>	<i>St aureus</i>	<i>Str equi</i>	<i>P haemolytica</i>	<i>P multocida</i>	<i>Ps aeruginosa</i>	<i>Act equuli</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1	3B6.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Les 14 anticorps monoclonaux testés reconnaissent les sept souches sauvages de *T. equigenitalis*. 3 d'entre eux donnent une réponse plus faiblement positive, à savoir 7B7.1 ; 7B7.10 et 10C9.6.

5       Aucun des 14 anticorps monoclonaux testés ne reconnaît une des 8 souches bactériennes qui n'appartiennent pas à l'espèce *T. equigenitalis*.

Ces résultats démontrent la spécificité des 14 anticorps monoclonaux testés envers les souches de *T. equigenitalis* et l'absence de réactivité croisée entre *T. equigenitalis* et d'autres bactéries, n'appartenant pas à l'espèce *T. equigenitalis*, et, soit ayant été décrites avec les outils de l'art antérieur comme présentant une réactivité croisée avec cette espèce (*Actinobacillus equuli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*,  
10 *Straphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*) soit faisant partie de la flore génitale courante (*Streptococcus equi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*).  
15

20       Les réactions positives de l'antisérum polyclonal de lapin observées en IIF avec *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas fluorescens* n'ont donc pas été observées avec les anticorps monoclonaux de l'invention.

Les anticorps monoclonaux objet de la présente  
25 demande ne détectent pas de différence antigénique entre les différentes souches de *T. equigenitalis* testées.

- SAT (Serum Agglutination Test)

30       Pour tester la réactivité des anticorps monoclonaux au SAT, seule la souche R-19 a été utilisée.

Les résultats obtenus sont donnés dans la colonne 4 du tableau III ci-après.

13 des 14 anticorps monoclonaux donnent une réponse positive.

5

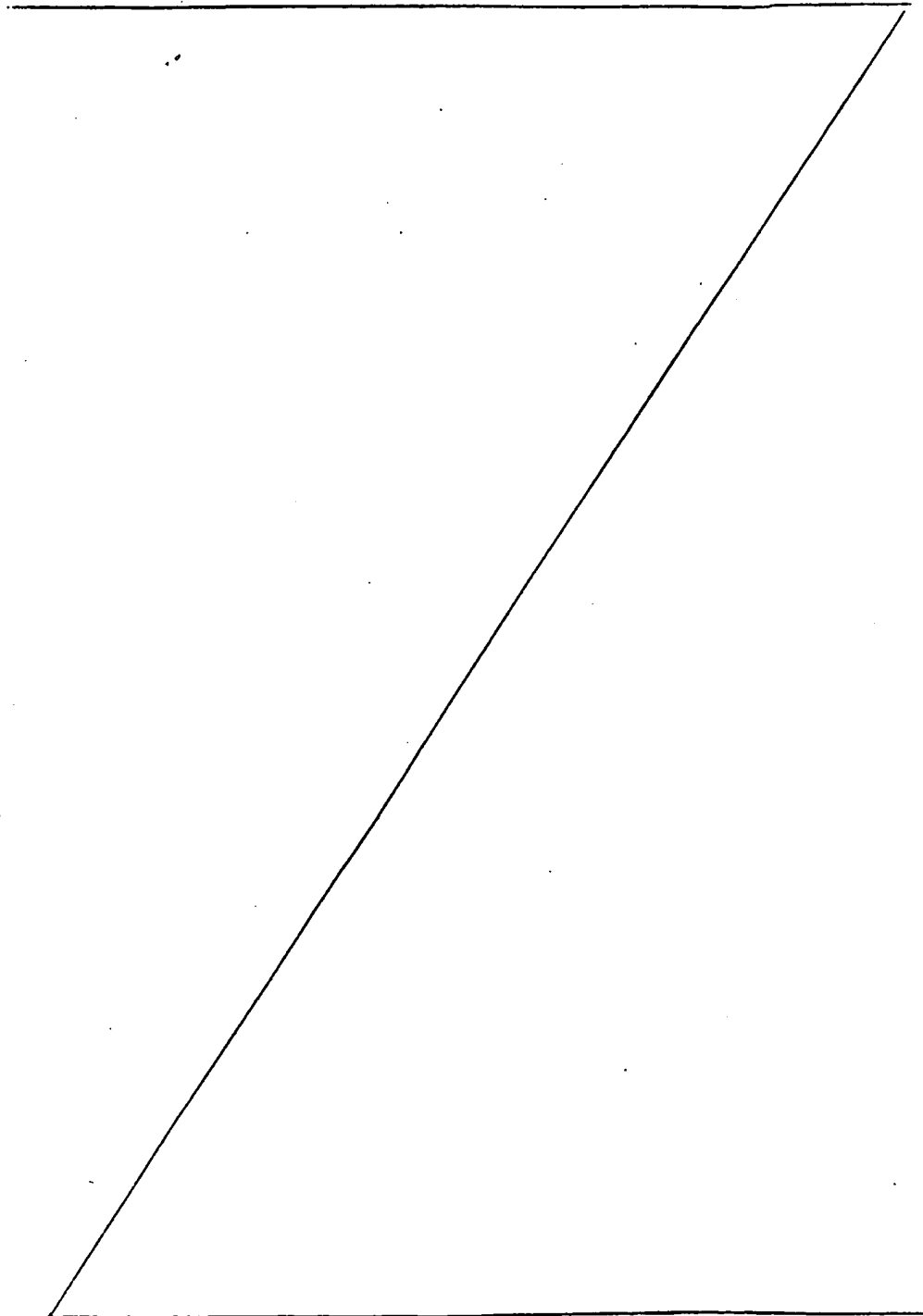


TABLEAU III

N°	Désignation de l'AcM	IIF	SAF	Immunoblot	Dot blot avec dénaturation	Dot blot sans dénaturation	Spécificité monoclonale (kDa)	Isotype
1	3B6.1	+	+	+	+	+	150	IgM
2	3B6.4	+	+	-	-	+		IgM
3	3B6.11	+	+	-	-	+		IgM
4	7B7.1	+	-	-	-	+		IgG1
5	7B7.10	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG1
6	7B8.1	+	+	+	+	+	52.7	IgG3
7	7C4.10	+	+	+	+	+	52.7	IgG3
8	7D7.3	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgM
9	7D7.16	+	+	-	-	+		IgM
10	10C4.17	+	+	-	-	+		IgG3
11	10C9.6	+	+	-	-	+		IgG2b
12	11C9.1	+	+	+	+	+	120	IgG2b
13	11C9.4	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG2b
14	11C9.5	+	+	+	+	+	22 (LPS)	IgG2b

- localisation d'épitopes spécifiques

préparation des extraits protéiques et  
lipopolysaccharidiques de la souche R-19 de *T.*  
5 *equigenitalis*

- Extrait en conditions non dénaturantes (EN) de *T.*  
*equigenitalis*

Les cellules de *T. equigenitalis* ont été récoltées  
10 par centrifugation (6000 g, 10 min) et lavées trois fois  
dans une solution de PBS 0,1 M à pH 7,4. Les culots ont  
été remis en suspension dans un petit volume de tampon  
SDS (sodiumdodécylsulfate à 2 %, PBS pH = 7,4) et mis à  
incuber à 37°C pendant 30 min. A la suite de ce procédé,  
15 les protéines conservent leur activité biologique. Après  
extraction dans le tampon SDS, l'intégrité des cellules a  
été contrôlée par observations en microscopie à contraste  
de phases. Après centrifugation (10000 g, 10 min), les  
surnageants contenant EN ont été complètement dialysés  
20 contre de l'eau distillée à 4°C pendant 48 h, répartis en  
aliquotes et conservés à l'état congelé (-80°C) jusqu'à  
utilisation. La concentration en protéines de EN a été  
déterminée à l'aide du test protéique BioRad (BioRad,  
Ivry-sur-Seine, France).

25

- Extrait en conditions dénaturantes ED

Les extraits EN des souches de *T. equigenitalis* ont  
été dissouts dans un solvant échantillon (Tris.HCl 0,1 M  
pH 6,8 ; glycérol 10 % ; SDS 2 % ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM  
30 et bleu de bromophénol 0,01 %) afin d'obtenir une  
concentration en protéines de 1 mg/ml, puis ont été

portés à ébullition à 100°C pendant 5 min (extrait en conditions dénaturantes de *T. equigenitalis*, ED).

- Extrait lipopolysaccharidique (LPS)

5 Des extraits EN digérés par la protéinase K ont été utilisés comme extraits LPS (Hanner et al., 1991 Am. J. Vet. Res. 52,1065-1068). 10 µl de EN ont été dilués dans 35 µl du tampon de digestion pour LPS. Ce tampon de digestion pour LPS est constitué de 0,0625 M Tris.HCl pH 10 6,8 ; 0,1% SDS ; 10 % glycérol et de 5 µg de protéinase-K (Sigma). Ces préparations ont été incubées à 57°C pendant 1 heure et chauffées à 100°C pendant 5 min avant électrophorèse.

15 - électrophorèse sur gel de polyacrylamide dodecylsulfate de sodium (SDS - PAGE)

Pour la séparation des protéines bactériennes, une électrophorèse discontinue SDS-PAGE a été utilisée 20 (Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685). Le gel de séparation contenait 12 % d'acrylamide et le gel de staking 4 % d'acrylamide. 20 µl de chaque échantillon ED ont été déposés au fond des puits à une concentration équivalente à 5 µg de protéines par piste. 25 L'électrophorèse a été réalisée à 100 V, 50 mA (courant continu) pendant 10 h dans une unité verticale de plaques pour gel (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, CA). Pour les déterminations de poids moléculaire, un kit destiné à la calibration des faibles poids moléculaires 30 (Pharmacia-Biotech, Saint-Quentin en Yvelines, France) a été utilisé. Pour visualiser les bandes sur la matrice de polyacrylamide, on a utilisé la coloration au Coomassie

R350 (Pharmacia-Biotech, France) et pour la visualisation des composants LPS, la coloration argentique (Tsai et Frasch, 1982 Anal. Biochem. 199, 115-119).

5

- immunoblotting

Les bandes de protéines ont été transférées du gel  
10 sur une membrane Immobilon<sup>R</sup> PVDF (Millipore Corp., St  
Quentin en Yvelines, France) par électroblotting à l'aide  
d'une cellule de transfert électrophorétique MiniTrans-  
Blot<sup>R</sup> (BioRad) avec une solution tampon de transfert  
(Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 20 % v/v ; pH =  
15 8,3) à 100 V, 250 mA pendant 1 heure. Pour vérifier les  
conditions de transfert électrophorétique et pour  
identifier les bandes protéiques sur les membranes, on a  
utilisé la coloration des protéines totales par l'or  
colloïdal (BioRad, Colloidal Gold Total Protein Stain).  
20 Après transfert, les membranes ont été immergées pendant  
30 min dans une solution bloquante (gélatine 3 % dans  
Tris 20 mM et NaCl 0,5 M) et rincées sous douce agitation  
dans une solution de lavage (Tris 20 mM ; NaCl, 0,5 M ;  
Tween<sup>R</sup> 20 0,05 %).

25 Les membranes ont alors été mises en contact avec  
des solutions d'anticorps monoclonaux diluées de 1/100 à  
1/1000 dans le tampon pour anticorps (Tris 20 mM ; NaCl  
0,5 M, Tween<sup>R</sup> 20 0,05 % gélatine 1 %) pendant 180 min à  
25°C.

30 La fixation des anticorps monoclonaux aux bandes  
peptidiques a été visualisée à l'aide de phosphatases  
alcalines (PA) conjuguées à des immunoglobulines IgG de

chèvre (chaînes lourdes et légères) anti-souris (BioRad, dilution à 1/2000) et à l'aide d'une solution substrat pour PA (BioRad).

Un sérum positif provenant de souris immunisées avec  
5 une souche de référence de *T. equigenitalis* et un sérum négatif issu de souris non immunisées ont été utilisés comme témoins expérimentaux. La figure 2 illustre un immunoblot entre les protéines bactériennes et les AcM selon l'invention d'une part et le sérum positif de  
10 souris d'autre part.

Le sérum positif collecté de souris immunisées réagit avec 5 protéines de la souche R-19 : 120 kDa ; 52,7 kDa ; 33,4 kDa ; 17,5 kDa et 22 (LPS) kDa.

8 des 14 anticorps monoclonaux testés réagissent  
15 positivement et 6 d'entre eux négativement. Les épitopes spécifiques reconnus par ces 8 anticorps monoclonaux réagissant positivement sont :

150 kDa pour l'anticorps monoclonal 3B6.1,  
120 kDa pour l'anticorps monoclonal 11C9.1,  
20 52,7 kDa pour les anticorps monoclonaux 7B8.1 et 7C4.10,  
22 kDa (LPS) pour les anticorps monoclonaux 7B7.10, 7D7.3, 11C9.4 et 11C9.5

Ces résultats sont également rassemblés dans le  
25 tableau III, colonnes 5 et 8.

#### - dot-blotting

Des membranes Immobilon<sup>R</sup> PVDF (Sigma) ont été pré-  
30 humidifiées avec une solution de méthanol à 100 % pendant 1 à 3s, immergées dans de l'eau distillée pendant 1-2 min afin d'éluer le méthanol et équilibrées dans une solution

de lavage (Tris 20 mM ; NaCl 500 mM ; Tween<sup>R</sup> 20 0,05 % ; pH = 7,5). Les extraits EN et ED ont été fixés aux membranes par incubation pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes dot ont été lavées deux fois pendant 10 min dans la solution de lavage puis immergées dans la solution bloquante (gélatine 3 % dans Tris 20 mM et NaCl 500 mM) pendant 1 heure. Les membranes ont été lavées deux fois comme précédemment et incubées avec les anticorps monoclonaux sélectionnés dans les mêmes conditions que pour l'immunoblotting.

La fixation des anticorps monoclonaux aux membranes de dot blot a été révélée à l'aide de PA conjuguées à des immunoglobulines IgG de chèvre (chaînes lourdes et légères) anti-souris et à l'aide d'une solution substrat pour PA (BioRad).

Les mêmes sérums, témoins positifs et négatifs, ont été utilisés tout comme pour l'immunoblotting.

Pour déterminer si les résultats négatifs observés sur l'immunoblotting sont dus au fait que les épitopes ont été endommagés par les réactifs dénaturants utilisés pour préparer les extraits, les 14 anticorps monoclonaux sont confrontés en dot-blot aux extraits EN et ED de la souche R-19.

Sur la figure 3, on rapporte en dot blot les protéines de R19 ayant réagi sur les pistes 1 à 14 avec les AcM du tableau III, sur la piste SP avec le sérum positif de souris et sur la piste SN avec le sérum négatif de souris. Les résultats obtenus sont également rassemblés dans le tableau III, colonnes 6 et 7.

Les 6 anticorps qui présentent un immunoblot négatif présentent également un dot-blot négatif avec les extraits dénaturés de la souche R-19 (Tableau III,

colonnes 5 et 6). Ils présentent cependant un dot-blot positif avec les extraits non dénaturés (Tableau III, colonne 7).

En conditions non dénaturantes (traitement au SDS  
5 seulement), la conformation et l'activité des protéines restent intactes mais, sous des conditions réductrices (traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol et hautes températures), la conformation de certaines protéines change et les  
10 épitopes sont détruits. L'absence de réactivité des 6 anticorps monoclonaux testés en immunoblot avec la souche R-19 est donc très vraisemblablement due à de tels changements de conformation et destruction d'épitopes.

8 anticorps monoclonaux qui conservent leur réactivité sur les extraits bactériens ED ont donc été  
15 produits.

Ces 8 anticorps monoclonaux peuvent donc constituer des réactifs appropriés à la détection des antigènes de *T. equigenitalis* et, plus particulièrement, au diagnostic de la MCE. De tels anticorps peuvent servir à  
20 caractériser des bactéries du genre *Taylorella* dans toute préparation biologique utilisant des conditions dénaturantes.

#### - Détermination de l'isotype

25

Pour la détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux, on a utilisé le kit immunotype de chez Sigma qui est constitué de bandelettes de nitrocellulose pré-recouvertes d'anticorps anti-isotype d'immunoglobulines  
30 de souris. Après incubations supplémentaires, l'identité

Les résultats obtenus figurent dans la colonne 9 du tableau III.

Les 14 anticorps monoclonaux produits font partie des IgM pour 5 d'entre eux, des IgG2b pour 4 d'entre eux, 5 des IgG3 pour 3 d'entre eux et des IgG1 pour 2 d'entre eux.

Exemple 3 :

10 **Essai comparatif des différents tests de diagnostic de la MCE**

a) culture bactériologique de la flore bactérienne

b) détection par polyclonaux et IIF

15 c) détection par l'invention objet de la présente demande : monoclonaux et IIF.

Pendant 1 mois, 368 écouvillons de juments (fosse clitoridienne, de col utérin) et d'étalons (liquide liquide pré-éjaculatoire, fosse uréthrale) ont été étudiés 20 par les deux techniques d'immunofluorescences, la technique au sens de la note de service du Ministère de l'agriculture et de la pêche (DGAL/SDSPA/N95/N°8037) avec anticorps polyclonaux et la technique selon l'invention. Les positifs par l'une des deux techniques ont subi un 25 isolement par culture sur milieux gélosés. 64 prélèvements ont été trouvés positifs avec les anticorps polyclonaux et 17 avec les anticorps monoclonaux ; aucune mise en culture n'a permis d'isoler de bactérie *T.equigenitalis*.

30 Ces résultats mettent bien en évidence la plus forte spécificité apportée par l'invention dans cette étude.

**Exemple 4 :** Autre essai comparatif

Un deuxième essai visant à comparer le dépistage de la MCE par culture bactériologique, par polyclonaux et IIF et par l'invention objet de la présente demande (monoclonaux et IIF) a été mené sur 1014 échantillons représentant l'ensemble des demandes d'analyse.

1 *T. equigenitalis* a été isolée par culture bactériologique (sur 1014 échantillons), 58 fluorescences ont été établies avec les anticorps monoclonaux selon l'invention (6%) et 409 avec les anticorps polyclonaux (40%).

Les différences mesurées entre les anticorps monoclonaux et polyclonaux sont statistiquement significatives avec une probabilité supérieure à 99,9% (Test Khi 2).

Les techniques de dépistage par anticorps et immunofluorescence indirecte, à savoir la technique "anticorps polyclonaux" et la technique objet de la présente invention, ont toutes deux dépisté la *T. equigenitalis* isolée par culture bactériologique.

La spécificité des anticorps monoclonaux selon l'invention, utilisés dans le cadre de l'immunofluorescence indirecte, est meilleure que celle des anticorps polyclonaux (94% vs 60%).

**Exemple 5:** Elimination de réactions non "antigène-anticorps".

Des réactions non spécifiques peuvent parfois être obtenues entre des anticorps et des *Staphylococcus*

l'intermédiaire de protéines (protéine A pour *S. aureus* et protéine G pour les Streptocoques de groupes C et G). Les réactions ne sont pas de type antigène-anticorps.

De telles réactions non spécifiques peuvent être observées avec les anticorps monoclonaux selon l'invention : en effet, 2 souches de bactéries connues pour produire des protéines A et G (*Staphylococcus aureus* souche Cowan et Streptocoques souche 26RP66) ont été soumises à la technique de détection selon l'invention, à savoir anticorps monoclonaux et immunofluorescence indirecte, et ont toutes deux donné une fluorescence (la souche R-19 de *T. equigenitalis* a servi de témoin expérimental).

Afin d'éliminer ces réactions non spécifiques, une technique dite blocking a été mise au point.

Des anticorps monoclonaux selon l'invention conjugués à FITC, destinés à une détection en immunofluorescence directe, ont été réalisés.

Deux anticorps monoclonaux selon l'invention, un IgG2b (10C9.6) et un IgG3 (7C4.10) ont été concentrés 10 fois par précipitation au sulfate d'ammonium et purifiés sur une colonne de Protéine A Sépharose (Pharmacia) par adsorption dans un tampon Tris 100mM pH 8 et élution dans un tampon 100mM glycine pH 3. Les anticorps ainsi purifiés ont été marqués par FITC Isomère gamma (fluorescein isothiocyanate) et les conjugués anticorps-FITC ont été séparés des molécules non marquées par passage dans une colonne Sephadex G25 (Pharmacia).

Trois types de lames ont été réalisés :

- *T. equigenitalis* souche R-19 streptomycine résistante,

- *Staphylococcus aureus* souche Cowan,
- *Streptococcus* de groupe C souche 26RP66.

Ces lames ont ensuite été soumises au blocking par incubation à 37°C pendant 1h dans un sérum dépourvu  
5 d'anticorps anti-*T.equigenitalis*. Trois sera ont été comparés : sérum de souris, sérum de lapin et sérum humain.

Après lavages au PBS et rinçages à l'eau distillée, les lames sont incubées 1h à 37°C avec les anticorps  
10 monoclonaux selon l'invention marqués par FITC décrits ci-avant.

Après lavage et rinçage final, les lames sont montées dans de la glycérine, tamponnées et examinées sous un microscope à fluorescence.

15 Ces trois techniques de blocking donnent une fluorescence pour les lames *T.equigenitalis* et ne donnent pas de fluorescence pour les lames de liaisons non spécifiques (*S.aureus* et *Streptococcus*).

Le meilleur blocking a été obtenu avec le sérum de  
20 souris.

Il est donc possible avec la technique de détection selon la présente invention d'éliminer les réactions non spécifiques tout en conservant la réaction spécifique antigène-anticorps.

25 Cette technique de blocking par sérum dépourvu d'anticorps anti-*T.equigenitalis* et immunofluorescence directe peut être avantageusement utilisée en confirmation des résultats positifs obtenus par la technique d'immunofluorescence indirecte et anticorps  
30 monoclonaux selon l'invention.

Exemple 6 : Production d'anti-anticorps anti-Taylorella equigenitalis.

1. Production des anticorps monoclonaux anti-T.  
5 *equigenitalis* (AcM1)

On opère comme indiqué ci-dessus.

2. Purification des AcM1

Les AcM1 sont précipités par addition de sulfate  
d'ammonium saturé à la concentration finale de 50%. Après  
10 centrifugation, le précipité est remis en suspension dans  
du PBS, puis filtré sur gel de Séphadex® G75 (Pharmacia)  
et enfin purifié par chromatographie d'affinité sur une  
colonne de protéine A- Sépharose® CL-4 B

3. Préparation de l'immunogène

15 Les AcM1 purifiés sont homopolymérisés en présence de  
glutaraldéhyde à 0,25 % pendant heures à 4°C. La réaction  
est stoppée par adjonction d'un tampon glycine 0,2M et  
les polymères sont dialysés contre du PBS.

4. Immunisation de souris

20 Des souris BALB/C sont immunisées par 1 injection SC d'un  
mélange à partie égale de 50µg d'AcM1 polymérisés et  
d'adjuvant de Freund complet. 2 injections ultérieures  
sont pratiquées à 2 semaines d'intervalle, l'une avec de  
l'adjuvant de Freund incomplet, et l'autre sans aucun  
25 adjuvant et par voie péritonéale.

5. Obtention des anticorps monoclonaux anti-anticorps  
contre *T.equigenitalis*. (AcM2)

On procède comme décrit plus haut.

6. Purification des fragments Fab des AcM1

30 Des fragments Fab des anticorps AcM1 sont purifiés après  
digestion des AcM1 par de la papaïne (incubation 45 min à

37°C des AcM1 dans une solution de papaine, de 2- $\beta$ -mercaptoéthanol, d'EDTA 1,5M à pH8. le rapport est de 10 $\mu$ g de papaine par mg d'AcM1. La digestion est stoppée par l'addition de N-méthylmaléimide 10mM (Sigma). Les anticorps non digérés et les fragments Fc sont éliminés par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine A-Sépharose CL-4B® (Pharmacia). La pureté des fragments Fab est vérifiée par SDS-PAGE.

7. Criblage des hybridomes producteurs d'AcM2 par un test ELISA

Les microplaques (Maxisorb, Nunc) sont incubées 16h à 4°C avec 100  $\mu$ l/puit d'une suspension de 0,2  $\mu$ g/ml de Fab dans du tampon carbonate pH8. Les microplaques sont lavées 3 fois avec du PBS-Tween 20® (0,05%), pH 7,2, puis les sites non spécifiques sont bloqués par une solution de BSA 2% dans le PBS-Tween 20® pendant 30 min à 37°C. Après 3 lavages par du PBS-Tween 20®, les surnageants de culture des hybridomes sont incubés 1h à 37°C. Après 3 lavages par du PBS-Tween 20®, la réaction est révélée par un conjugué anti-souris marqué à la peroxydase et son substrat.

Les hybridomes positifs par le test ELISA sont sélectionnés et les surnageants sont utilisés pour la préparation du vaccin.

8. Préparation du vaccin

Les anticorps AcM2 des hybridomes sélectionnés, puis leurs fragments Fab correspondants sont purifiés selon les méthodes décrites ci-dessus.

Les fragments Fab sont couplés à la keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma) par incubation pendant 16h à 4°C dans une solution 0,05% de glutaraldéhyde (Sigma), dans

un rapport de 1/1. La réaction est stoppée par une solution de glycine 0,02M et les conjugués sont dialysés contre du PBS. La protéine est dosée à 25-100µg par dose de vaccin et le vaccin est additionné d'hydroxyde  
5 d'alumine à titre d'adjuvant.

## REVENDEICATIONS

1/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, plus particulièrement, leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>,  
5 caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*.

2/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, plus particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils ne  
10 présentent pas de réaction croisée avec un ou des épitope(s) d'une bactérie d'une espèce *Taylorella* différente ou d'une bactérie d'un genre différent.

3/ Anticorps monoclonaux ou leurs fragments, selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils sont  
15 capables de reconnaître des protéines de *T. equigenitalis* du groupe comprenant des protéines telles que les protéines de 150 kDa, 120 kDa, 52,7 kDa ou 22 (LPS) kDa.

4/ Anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils peuvent être obtenus à partir d'hybrides  
20 - par fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T. equigenitalis* inactivée ou d'extrait(s) d'une telle souche, et

25 - clonage et sélection selon la propriété de leur surnageant de culture à reconnaître un ou des épitope(s) d'une bactérie de l'espèce *T. equigenitalis*,

- récupération des anticorps monoclonaux recherchés, suivie le cas échéant d'une purification.

30 5/ Protéines immunogènes, caractérisées en ce qu'elles sont capables d'interagir avec des anticorps

monoclonaux ou leurs fragments selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6/ Anticorps monoclonaux, et leurs fragments, particulièrement leurs fragments Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>,  
5 caractérisés en ce qu'il s'agit d'anti-anticorps, à savoir d'anticorps capables d'interagir avec les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

7/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux  
10 selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris immunisées à l'aide d'une souche de l'espèce *T.*  
15 *equigenitalis* ou d'extrait(s) d'une telle souche,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que notamment l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture présentent une réaction positive avec une bactérie de  
20 l'espèce *T. equigenitalis* ou un fragment de celle-ci,

- la sélection par clonage de tels hybridomes au regard de leur réactivité, par rapport à *T. equigenitalis*, et

- la récupération des anticorps monoclonaux, suivie  
25 le cas échéant de leur purification.

8/ Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fusion de cellules de myélome murin non sécrétrices avec des cellules spléniques issues de souris  
30 immunisées à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de leurs fragments tels que défini(s) dans l'une des revendications 1 à 4,

- le criblage à l'aide d'une technique de révélation, telle que notamment l'immunofluorescence indirecte, des hybridomes dont les surnageants de culture présentent une réaction positive avec l'un desdits  
5 anticorps monoclonaux ou leurs fragments,

- la sélection par clonage de tels hybridomes, et
- la récupération des anti-anticorps recherchés.

9/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon  
10 l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10/ Souches d'hybridomes caractérisées en ce qu'elles sont capables de sécréter des anticorps monoclonaux selon la revendication 6.

11/ Méthode d'identification d'une bactérie de  
15 l'espèce *T. equigenitalis* dans un échantillon ou dans une culture, comprenant :

- la mise en contact de l'échantillon ou de la culture à analyser, susceptible de renfermer *T. equigenitalis*, avec

20 i. une quantité efficace d'au moins un anticorps monoclonal ou un fragment d'un tel anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et, optionnellement, blocage des réactions non antigène-anticorps,

25 ii. ou, en variante, pour mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *T. equigenitalis* avec une protéine immunogène selon la revendication 5 ou un anticorps selon la revendication 6, dans des conditions permettant une réaction du type antigène-anticorps, et

30 - la révélation du produit de réaction de type antigène-anticorps éventuellement formé.

12/ Méthode de diagnostic d'une infection par *T. equigenitalis*, plus particulièrement de la métrite contagieuse équine dans un échantillon ou une culture, comprenant :

- 5       - la mise en contact d'un ou plusieurs anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou de leurs fragments, avec un prélèvement biologique, et
- 10       - la révélation de la réaction du type antigène-anticorps produite dans le cas de la présence de *T. equigenitalis* dans le prélèvement,
- 15       - et, optionnellement, le blocage des réactions non antigène-anticorps, par exemple, par saturation de l'échantillon prélevé à l'aide d'un sérum dépourvu d'anticorps anti-*T. equigenitalis*.

13/ Kits pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisés en ce qu'ils comportent

- 20       - un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou au moins une protéine immunogène selon la revendication 5, ou un ou plusieurs anticorps monoclonaux, ou leurs fragments, selon la revendication 6,
- 25       - les réactifs, notamment les marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction immunologique visée, et, optionnellement, des réactifs de blocage des réactions non antigène-anticorps tels que sérum de souris,
- 30       - ainsi qu'une notice d'utilisation.

14/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment un ou plusieurs anticorps

monoclonaux, ou leurs fragments, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comme vecteurs de médicaments ou comme agents d'immunothérapie passive, seuls ou en association avec des véhicules pharmaceutiquement inertes.

15/ Compositions vaccinales, caractérisées en ce qu'elles renferment, en association avec des excipients physiologiquement acceptables, au moins une protéine immunogène telle que définie selon la revendication 5, ou un anticorps selon la revendication 6, ou un fragment d'un tel anticorps, en quantité suffisante pour susciter une réaction immunitaire.

16/ Utilisation des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4 pour l'élaboration de biocapteurs.

1/2

FIGURE 1

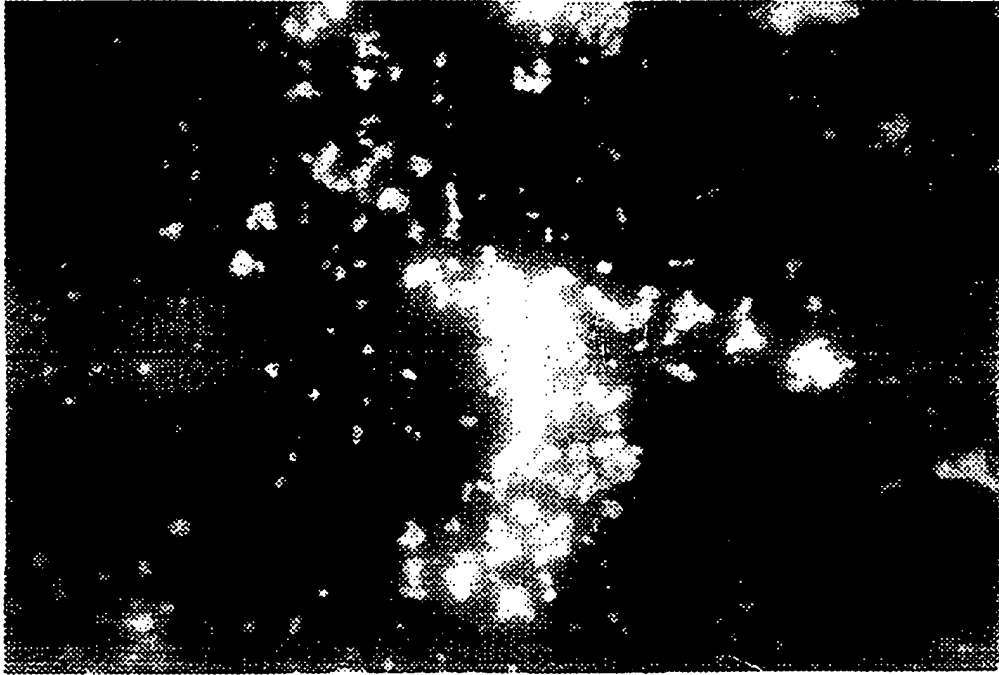
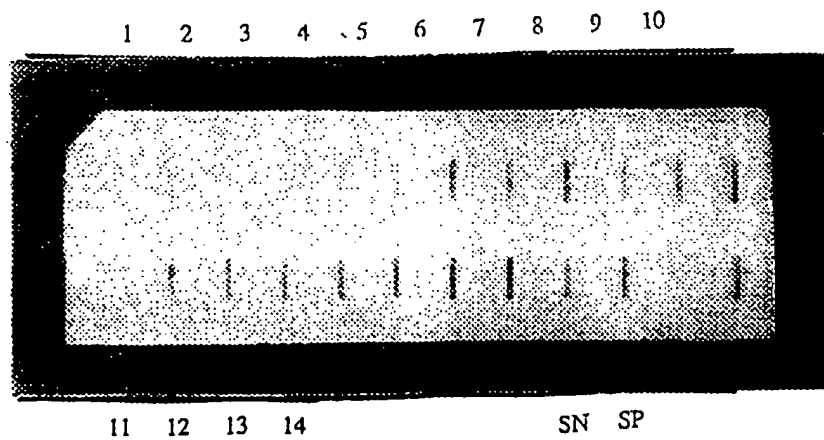
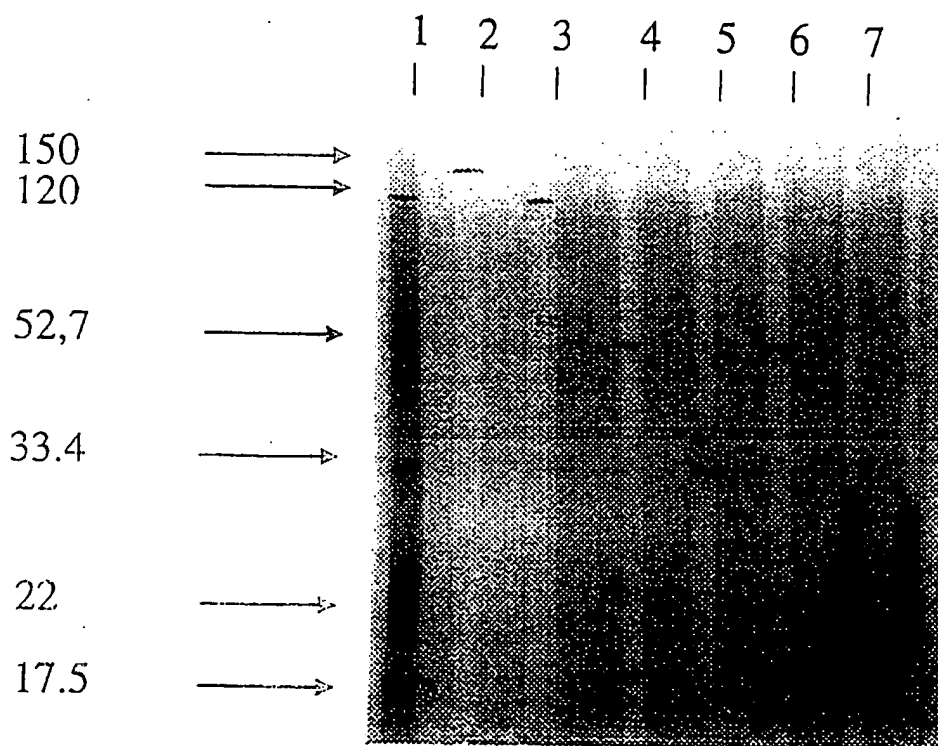


FIGURE 3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K16/12 C07K16/42 C07K14/285 C12N5/06 G01N33/569  
G01N33/577 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE VETERINARY RECORD, vol. 118, no. 20, 17 May 1986, LONDRES, GRANDE BRETAGNE, page 562 XP000615390 A. MACMILLAN ET AL.: "Antibodies reactive with Taylorella equigenitalis in equine sera." see the whole document ---	1-5,7, 11-14,16
A	WO 86 02360 A (TECHNOLOGY LICENCE COMPANY LIMITED) 24 April 1986 see examples see claims --- -/--	1-5,7, 9-14,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 1997

Date of mailing of the international search report

12.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No

PCT/FR 97/00649

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, October 1988, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 155-161, XP000615355 M. EGUCHI ET AL.: "Passive hemagglutination test for detection of antibodies against Taylorella (Haemophilus) equigenitalis in sera of mares." see abstract ---	1-5,7, 11-14,16
P,X	VETERINARY RESEARCH, vol. 28, no. 1, 1997, PARIS, FRANCE, pages 65-76, XP002038656 D. GRADINARU ET AL.: "Production and characterization of monoclonal antibodies against Taylorella equigenitalis." see the whole document -----	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00649

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8602360 A	24-04-86	EP 0201519 A JP 62500585 T	20-11-86 12-03-87
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/FR 97/00649

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6    C07K16/12    C07K16/42    C07K14/285    C12N5/06    G01N33/569 G01N33/577    A61K39/395		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6    C07K    C12N    G01N    A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THE VETERINARY RECORD, vol. 118, no. 20, 17 Mai 1986, LONDRES, GRANDE BRETAGNE, page 562 XP000615390 A. MACMILLAN ET AL.: "Antibodies reactive with Taylorella equigenitalis in equine sera." voir le document en entier ---	1-5,7, 11-14,16
A	WO 86 02360 A (TECHNOLOGY LICENCE COMPANY LIMITED) 24 Avril 1986 voir exemples voir revendications --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1-5,7, 9-14,16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 Août 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12.09.97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Nooij, F</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Denr. Internationale No  
PCT/FR 97/00649

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, Octobre 1988, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 155-161, XP000615355 M. EGUCHI ET AL.: "Passive hemagglutination test for detection of antibodies against Taylorella (Haemophilus) equigenitalis in sera of mares." voir abrégé	1-5,7, 11-14,16
P,X	--- VETERINARY RESEARCH, vol. 28, no. 1, 1997, PARIS, FRANCE, pages 65-76, XP002038656 D. GRADINARU ET AL.: "Production and characterization of monoclonal antibodies against Taylorella equigenitalis." voir le document en entier -----	1-16

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 97/00649

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)